基于电泳温度提升建立大鼠肝快速透明化模型

袁小川[1] 连芳[2] 赵荫农[1] 陈闯[1] 黄山[1] 李科志[1] 曾爱屏[1] 何剑波[1*] 邬国斌[1*]

[1] 广西医科大学附属肿瘤医院 广西 南宁 530021

[2] 广西医科大学基础医学院生理教研室 广西 南宁 530021

［摘要］ **目的**：探索一种基于 CLARITY 技术的快速肝组织透明化手段，为该技术在肝脏上的应用提供研究基础。**方法**：水凝胶灌注大鼠，取出肝脏待水凝胶凝固后切为 1mm 薄片。切片随机分为两组，对照组采用常规被动脂质清除法处理，实验组置于特制电泳装置中，在外加电场条件下洗涤脂质，通过提高电泳温度并量化组织透明度，探索最优肝透明化条件。**结果**：实验组在 12V 电压下 37°C 电泳 48h 时肝切片相对透明度达到最高并保持至 96h，随后相对透明度开始下降，而在 48h 电泳清除脂质后提高温度继续电泳 48h，肝组织切片相对透明度可进一步提高且对照组脂质清除速度明显低于实验组。**结论**：在 12V 电压下肝组织切片 37°C 电泳 48h 再辅以 52°C 电泳 48h 可以实现较快速的脂质清除。

［关键词］ CLARITY；电泳温度；肝切片；脂质清除；相对透明度；

Elevated temperature induced acceleration of electrophoretic tissue clearing process of rat liver tissue

YUAN Xiao-chuan[1] LIAN Fang[2] ZHAO Yin-nong[1] CHEN Chuang[1] HUANG Shan[1] LI Ke-zhi[1] HE Jian-bo[1] WU Guo-bin[1]

[1] Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi China 530021

[2] Department of physiology，Basic Medical School of Guangxi Medical University

［Abstract］ **Objective:** CLARIT is a morphological technique that produces structurally intact, yet optically transparent tissue, which has important applications in nervous system structure and function investigations. However in other organs, especially liver tissue, the researches are not comprehensive. Since the lipid in liver tissue is difficult to clear. The protocol is aim to make this process faster and easier. M**ethod**：The rat livers are fixed with hydrogel and cut into 1mm slices. The control group is cleared with passive method. On the other side, the experimental group is dealt with electrophoretic tissue clearing and elevate temperature as well to find the optimum temperature for the liver tissue clearing. **Results**: Under the condition of 12V 37°C,the experimental group become transparent after 48h electrophoresis， the relative-transparency is changeless when run with another 48h electrophoresis. If elevate the temperature of electrophoresis, after 48h basal electrophoresis (12V 37°C), the relative -transparency can be further improved. **Conclusion**：To create extremely clear liver tissue，the best electrophoretic tissue clearing procedure is to run the samples at 12V 37°C for 48 h followed by more 48h with the temperature increased to 52°C .

［Key words］ CLARITY； electrophoretic temperature ； liver slices； lipid clearing； relative-transparency

基金项目：国家自然科学基金（81460426）
广西壮族自治区医药卫生适宜技术推广项目（S201630）

通信作者：何剑波 电子信箱：gxhejianbo@outlook.com
邬国斌 电子信箱：gb.wu@126.com

CLARITY 是一种近年来出现的组织透明化技术，其核心原理是使用丙烯酰胺为主要成分的水凝胶固定组织中的蛋白质和核酸，并使用十二烷基磺酸钠（sodium dodecyl sulfate， SDS）为主要成分的去垢剂移除组织中的脂质成分，使大分子物质和光线能够透过组织，从而能够产生结构完整但光学透明的组织。这一技术能够从组织器官的层面研究神经、脉管系统以及蛋白质/核酸等结构，因此打破了传统的组织形态学研究在三维层面的局限性[1]。

该技术由 Deisseroth 于等 2013 年在《Nature》杂志首次介绍[2]，最初应用于神经系统的研究之中，目前在神经系统方面有了较多的应用和报道[3, 4]，尤其是脑组织的透明化，已经有了较为全面的条件探索和量化。然而其他的一些器官，例如肝脏，由于很难彻底去除脂质成分，其透明化研究现在还缺乏文献报道和数据支持，这阻碍了 CLARITY 技术在该领域的应用。 另一方面，虽然目前器官整体已经能实现透明化，但是在对完整器官进行免疫标记时，抗体的被动弥散渗入依然受到限制，500um 的免疫标记深度已是极限[2]。因此有必要对大鼠肝脏切片进行透明化条件的探索和优化，并系统量化这一过程。

CLARITY 技术中脂质的去除可以在电泳（electrophoretic tissue clearing， ETC） 的条件下进行以加快这一过程。已有文献报道提高温度可以进一步加快清除速度，但是会有损伤组织破坏组织形态的风险[5]。基于此，我们根据 Deisseroth 等在文章中介绍的原理，自制了专用的电泳设备[2]，并对大鼠肝切片电泳清除的温度进行了调控，初步总结了快速构建大鼠肝脏透明化模型所需要的方法和条件。

1 材料和方法

1.1 材料

20 只 8 周龄雌性 SD 大鼠购自广西医科大学实验动物中心，体重 180-220g，饲养室温度（20-25°C）， 湿度 50%~60%， 12 h/12 h 昼夜光周期， 大鼠维持饲料自由摄食和饮水。

丙烯酰胺（40%）、甲叉双丙烯酰胺（2%）购自 Bio-Rad 公司；热引发剂 VA-044（98%）购自 Wako 公司；分析纯多聚甲醛（95%）、分析纯氢氧化钠（96%）购自天津致远化学试剂有限公司；PBS 磷酸盐缓冲液购自迈新试剂公司；SDS（98.5%）、硼酸（99.5%）、Tritonx100、DAPI 购自 Sigma 公司；FocusClear 购自 CellExplorer 公司；凝胶成像仪为 BIO-RAD 公司 Universal Hood III 型；激光共聚焦显微镜为奥林巴斯公司 FV3000 型；电泳设备、切片模具自制。

水凝胶制备：冰上操作，以 200ml 水凝胶（HG）为例：丙烯酰胺（40%） 20ml，甲叉双丙烯酰胺（2%）5ml，VA-044 0.5g，10xPBS 20ml，加双蒸水至 200ml，分装后-20°C 冰冻保存备用。

清除液的制备：常温操作，以 1L 清除液为例：硼酸 12.4g，SDS 40g 加双蒸水至 1L，用 10M NaOH 调节 PH 至 8.5。

1.2 大鼠灌注

提前在 4℃冰箱或冰上解冻水凝胶溶液，去除气泡，同时备好 1xPBS 溶液，所有溶液均放置在冰桶内；在通风橱中备好手术及灌注器械。大鼠腹腔注射 400mg/kg 水合氯醛溶液，待完全麻醉后仰卧位固定四肢，沿双侧肋弓及胸骨切开，充分暴露心脏，针头插入左心室，并以血管钳固定，同时在心耳戳一小孔放血。先用蠕动泵以 10ml/min 的速度推入 100ml PBS 溶液，至排空大鼠血管内血液，改灌注 50ml 水凝胶溶液。完整解剖出肝脏迅速浸于 50ml 水凝胶中，在冰桶内转移至 4°C 冰箱中 3 日，以便水凝胶进一步渗透到组织中[6]。

1.3 大鼠肝脏水凝胶固定和切片

将标本瓶置于带有三通接口的专用容器内；充入氮气 2 分钟；关闭氮气方向接口，打开抽真空方向接口，抽真空 15-20 分钟；停止抽真空，再次充入氮气，迅速封闭标本瓶盖；标本瓶放入 37℃ 温箱 3 小时，待水凝胶凝固后取出，小心去除组织外周多余的水凝胶。将肝脏固定于专用切片模具上，选择组织较为平整的部位做 1mm 切片，共计 18 片。

1.4 肝切片透明度测定

为了便于分析肝切片在何种条件下清除效果更好，即组织更透明、抗体渗入效果更好。我们引入了相对透明度的概念，并使用国内实验室较为普遍的凝胶成像仪测量透明度，同时使用激光共聚焦显微镜测定 DAPI 对于肝切片的渗入深度来量化这一过程。

1.4（1）相对透明度测定

将肝切片覆盖于凝胶成像仪的测试卡上，使肝切片能够完全覆盖住测试卡的底片部位，然后透过肝切片组织使用凝胶成像仪测试底片的灰度值（组织透光性越好则测定灰度值越高）。即：

$$\text{相对透明度} = \frac{\text{处理后灰度值}}{\text{初始灰度值}}$$

1.4（2)细胞核荧光染料 DAPI 在肝组织中渗入深度测定

将肝切片从清除液中取出，放入盛有 PBST 液（含 0.1% Triton X-100 的 1× PBS）的 50ml 离心管中，置于摇床上常温洗涤 24h 以去除残余的 SDS 清除液。然后将切片置于避光容器中，加入 DAPI 工作液（10ug/ml）孵育过夜。PBST 液的避光洗涤 10min×3 次，浸泡于 FocusClear 折射率匹配液中孵育过夜[7]后置于载玻片上准备上样。激光共聚焦显微镜调整激发波长 360nm，将样品置于载物台上采用 20 倍目镜进行观测。实时观测结束后，以 5um 的层厚扫描 Z 轴，对样品作光学切片式逐层扫描，计算有荧光信号的组织渗透深度。

1.5 肝切片透明化

1.5（1）肝切片 ETC 清除基线数据获取

随机取 6 例肝切片，分为 ETC 实验组和被动清除对照组，每组各 3 例，并测定初始透明度。实验组切片置于网状的组织包埋盒中，固定在电泳小室电极的中间位置，使用水浴锅控制清除液温度为 37°C 恒温，调节电源固定电压 12V，总计电泳 120h，每 24h 更换一次清除液并测定组织相对透明度；对照组切片置于盛有 SDS 清除液的 50ml 离心管中，放于 37°C 温箱 120h，每 24h 更换一次清除液并测定组织相对透明度。

1.5（2）肝切片 ETC 温度提高效果对比

随机取 12 例肝切片，分为 42°C 组、47°C 组、52°C 组和 57°C 组，每组各 3 例，并测定初始相对透明度。每组切片首先于 37°C 12V 的条件下电泳清除 48h，并测定相对透明度。更换清除液调节水浴锅分别控制各组清除液温度为 42°C、47°C、52°C、57°C，保持电压不变，继续清除 24h，并分别测定各组组织相对透明度和 DAPI 渗入深度。

1.6 统计学处理

实验数据采用用均数±标准差表示，采用 SPSS19.0 统计分析软件进行统计检验，组间比较采用 t 检验和方差分析，$P<0.05$ 认为结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 ETC 设备原理示意图

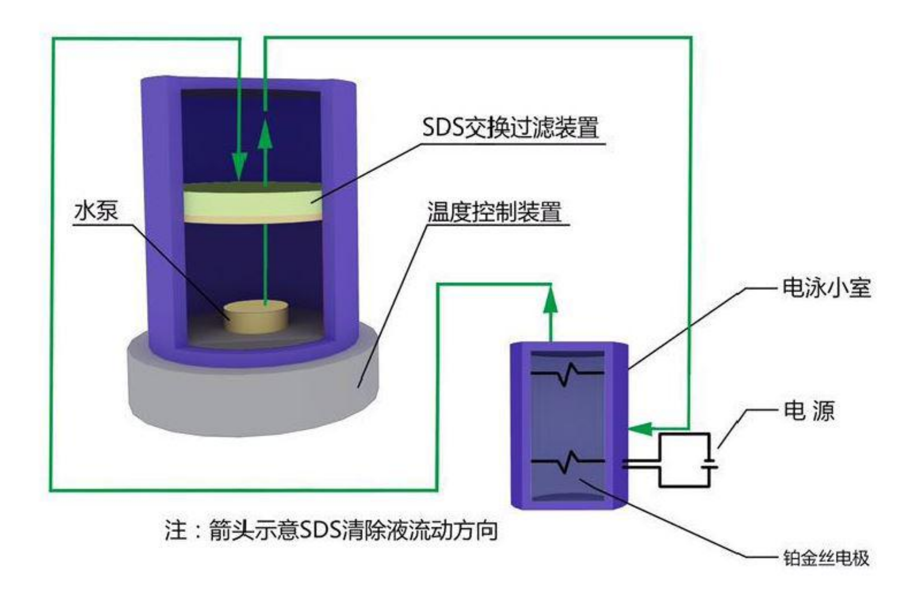


图 1 ETC 设备原理图

Fig.1 Schematic diagram of ETC

2.2 肝切片常规 ETC 基线数据

图 2 示经过 48h 清除后使用凝胶成像仪透过肝切片测定底片灰度值（左侧峰值为标尺，峰值越高组织越透明），如图示 ETC 组在 12v 37°C 条件下经过 48h 小时清除后底片灰度值快速上升，且明显高于 37°C 被动清除组（p=0.006）。说明肝切片 ETC 脂质清除速度比被动清除更快。

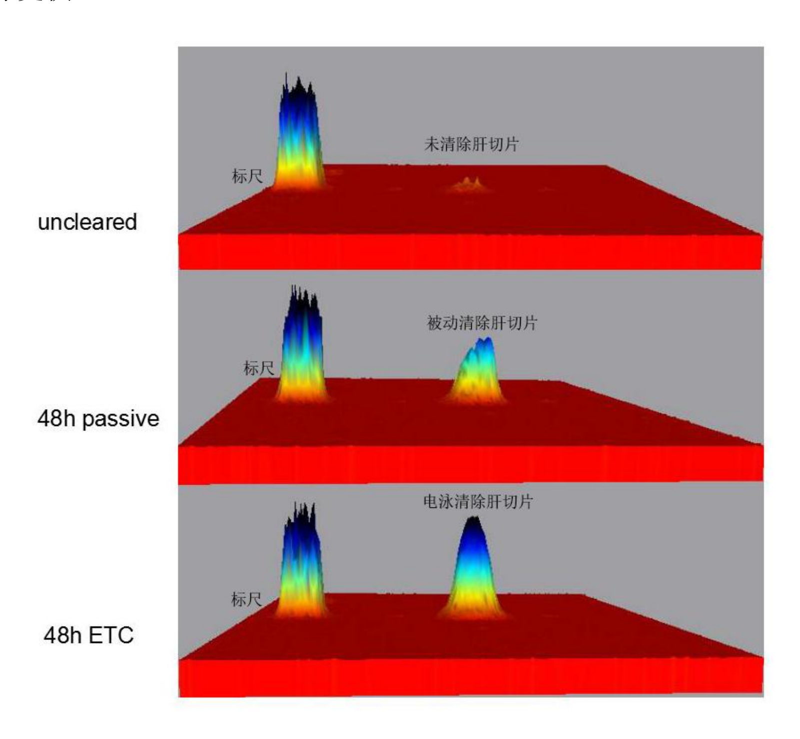


图 2 肝切片常规 ETC 与被动清除 48h 灰度值对比

Fig.2 Grey level improvement of liver slices，basal ETC compared with passive clearing

如图 3 所示，ETC 实验组肝切片 12v 37°C 条件下进行脂质清除，切片相对透明度经过 ETC 清除持续提高，在 24-48h 达到最大且与被动清除对照组差异最明显，48-96h 实验组切片相对透明度维持在一个相对稳定的值，96-120h 实验组切片相对透明度开始下降。与 ETC 实验组相比,37°C 被动清除对照组相对透明度提升较慢，清除速度低于 ETC 组

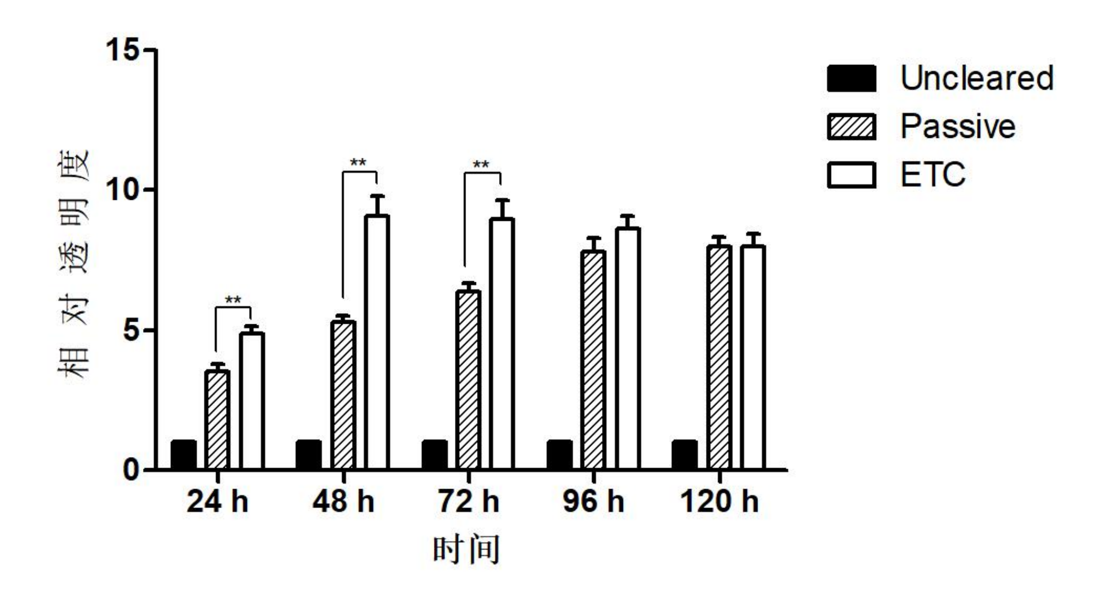


图 3 肝切片常规 ETC 与被动清除相对透明度对比

Fig.3 The relative-transparency improvement of liver slices , basal ETC compared with passive clearing

2.3 肝切片 ETC 温度提高效果比对比

图 4 示在经过 48h 12v 37°C 的基础电泳清除后，再增加 48h 的升温冲击清除肝切片的相对透明度继续提升，ABC 各组分别示增加 48h 12v 42°C 电泳、48h 12v 47°C 电泳、48h 12v 52°C 电泳。其中 52°C 升温电泳组与基础电泳清除相比较相对透明度提升更为明显（p=0.001），而 57°C 组组织发生形变未纳入统计。

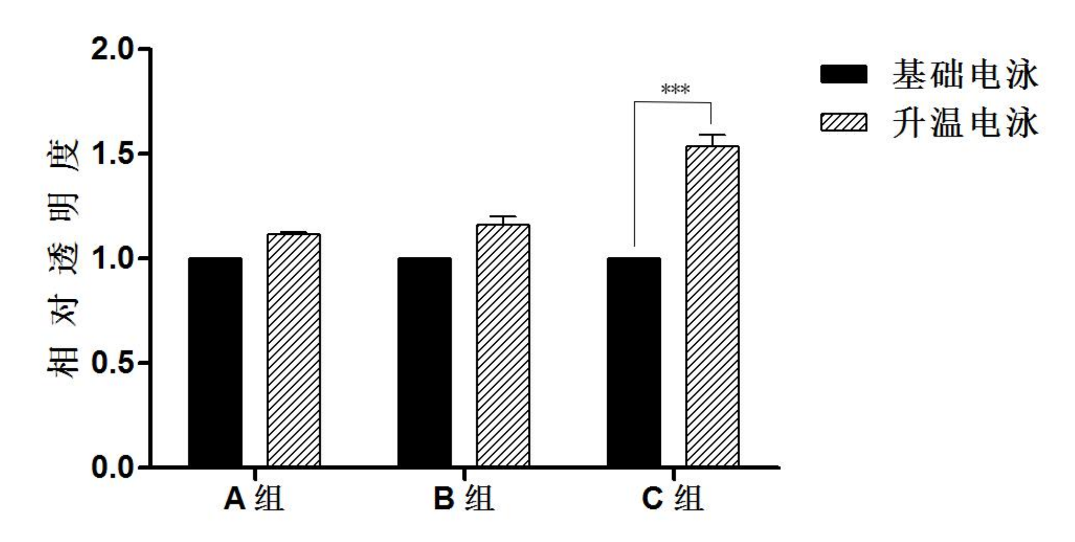


图 4 肝切片升温 ETC 后相对透明度变化

Fig.4The relative-transparency with ETC temperature elevated

图 5 示各组清除后效果肉眼观，可见清除后各组切片组织均有膨胀，与初始组织相比 48h 12v 37°C 的基础电泳清除使肝切片具有一定透明度，但是仍然有较多脂质成分未清除，再升温冲击清除 48h 后 52°C 温度组效果最明显，42°C /47°C 组效果一般，而 57°C 组虽然肝切片透明度得到一定提升但是组织形态遭到破坏发生了卷曲。被动清除 120h 后肝切片仍然不够透明。

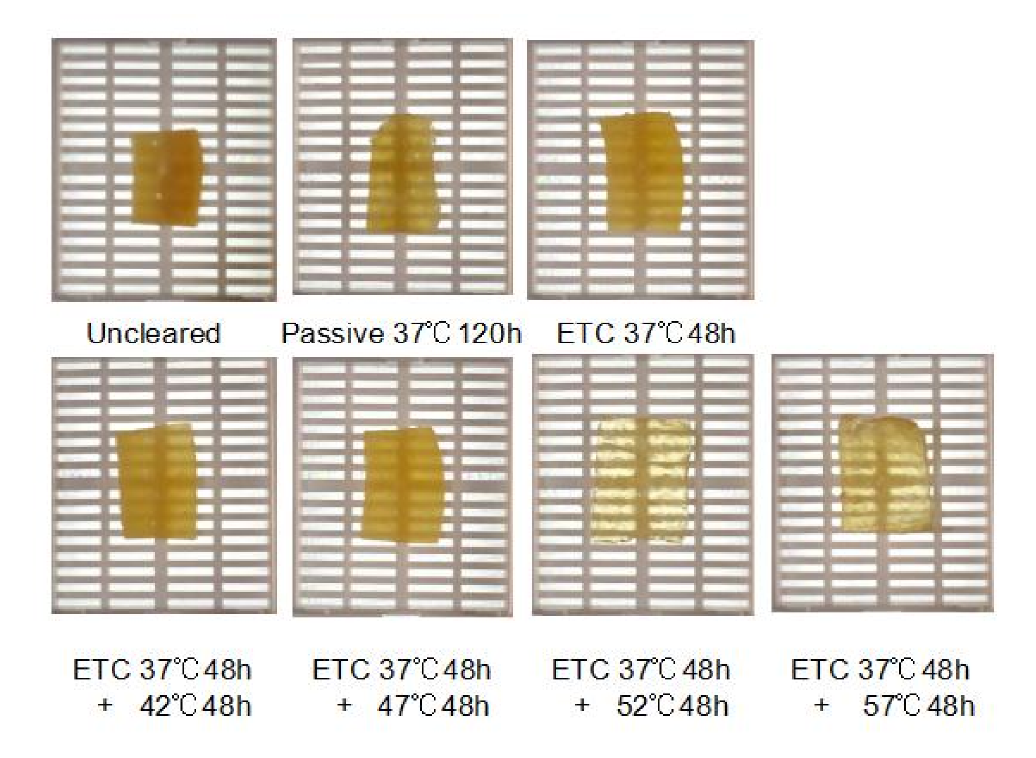


图 5 肝切片升温 ETC 后光学透明度变化

Fig.5 Optical transparency with ETC temperature elevated

2.5 升温 ETC 后肝切片 DAPI 渗入深度比较

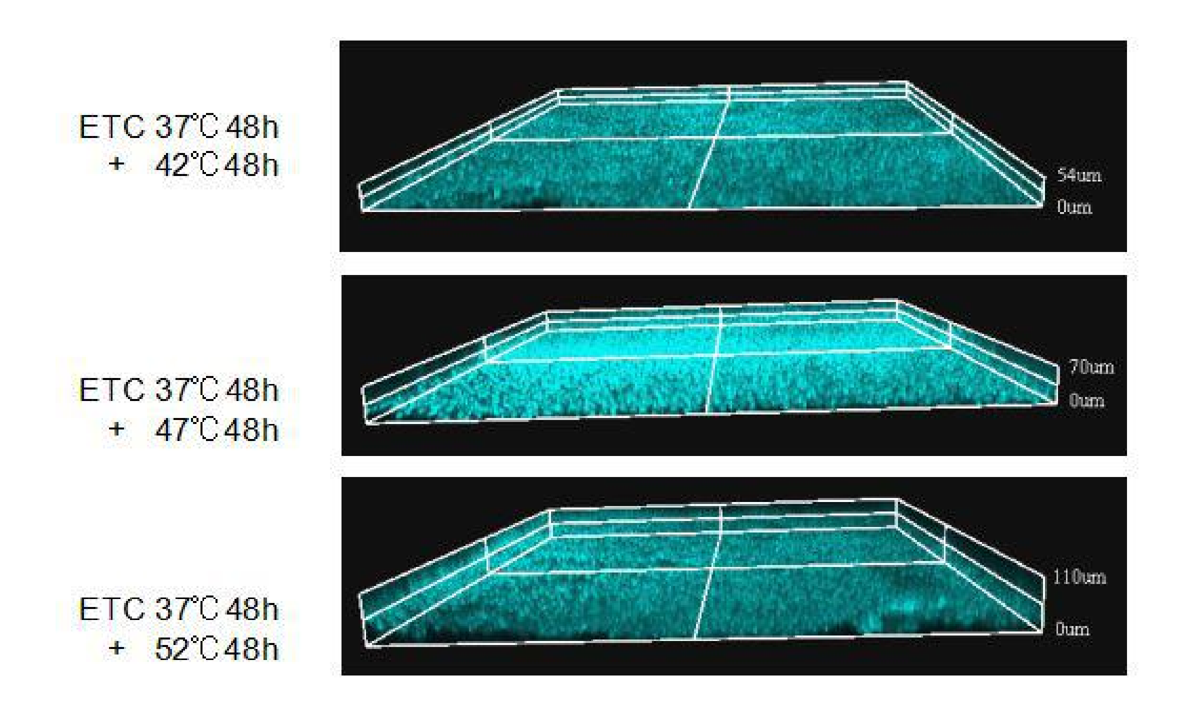


图 6 肝切片升温 ETC 后 DAPI 渗入深度对比

Fig.6 The effect of ETC temperature elevated on imaging depth

图 6 示使用奥林巴斯 FV3000 共聚焦显微镜扫描各升温 ETC 组肝切片 DAPI 渗入深度。可见肝切片的 DAPI 渗入深度随 ETC 温度提升而提高。其中 52℃升温组的肝切片 DAPI 渗入深度为 110um，明显高于 42℃升温组 54um，而 47℃升温组 DAPI 渗入深度介于两者之间。结果与相对透明度测定一致。

3.讨论

CLARITY 技术自 2013 年问世以来已经在脑及神经结构、功能和相关疾病机制研究方面有了广泛的应用[8-10]。由于脑组织脂质成分较容易清除，通常采用被动清除即可取得比较好的透明化效果，而被动清除相对 ETC 来说不需要额外设备，技术要求低，更利于推广[11]。但是对于肝组织而言常规的被动清除手段很难取得较满意的透明化效果，本项目研究发现大鼠肝组织切片经过 120h 的被动清除后相对透明度仍然不理想，而脑组织通常只需要 48h 被动清除即可取得比较好的效果[12]。因此需要 ETC 的方式加速肝组织的脂质清除。对于透明化组织的结构研究一般基于特定部位的荧光标记，目前有透明化组织的免疫荧光标记以及器官自发荧光的 GFP 转基因鼠器官的直接透明化两种常用方法。后者不依赖抗体的被动渗入标记成像效果更好，但是成本较高且器官中的荧光蛋白不能长期保存，不利于持续研究[13]。而免疫荧光标记相对而言更为灵活，可以随时对已透明化的器官组织进行标记，而且可以搭配不同的抗体进行多重荧光标记，但是这些依赖于抗体对组织的被动渗入深度。就目前的文献报道来看 1000um 的深度已经能够展示组织局部的三维层面结构[14]，因此我们选择大鼠肝脏 1mm 切片作为我们的研究对象。

决定组织透明化 ETC 清除速度的因素有很多：清除的组织类型、清除液 SDS 浓度、水凝胶成分、ETC 电压、ETC 温度等[15]，其中 ETC 温度对组织清除速度有着很大影响[5]。针对这点我们重点探讨了 ETC 温度对大鼠肝组织 1mm 切片的清除影响，从而提供一种肝组织快速透明化

的手段和思路。通常来说，在其他条件不变的前提下提高温度可以加快组织脂质清除速度，但是随之带来了组织结构损伤变形的问题。Deisseroth 等在文章中介绍透明化专用 ETC 设备采用了一个电极距离短，电场力强的电泳小室来对组织进行强力的脂质清除[2]，我们自制并改良了这一设备，在电泳液交换设备上增加过滤层滤除清除过程中产生的泡沫和电极杂质，最大程度上减少电泳设备对组织造成的损伤。一般来说，37°C 的 ETC 温度是一个较为安全的值，在我们的实验过程中很少观察到低电压（12v）37°C 电泳清除而导致组织变形的情况。然而在狭小的电泳小室中局部清除液可能会因为电极而升温而对组织产生损伤，尤其是在使用外部加热设备提高清除液温度的情况下组织的局部温度可能会更高，因此提高 ETC 温度对于组织脂质清除来说是把双刃剑。

在我们对大鼠肝切片的基础电泳（12v 37°C）的观察中发现，大鼠肝切片经过 48h 的清除可以达到一定的相对透光度但是仍有较多脂质成分未去除，后续即使再增加 3d 的 ETC，清除效果依然不明显，甚至组织可能因为长时间的 ECT 清除而使水凝胶产生变性导致相对透明度下降的趋势。脂质清除的主要原理通过 SDS 与膜质结合形成胶束，胶束内部亲水外部疏水从而将脂质成分从凝胶复合物中带出去[16]。另一方面在 Hammouda 的研究中已证实，通过提高温度可以减小 SDS 胶束的尺寸，使携带膜质的 SDS 胶束更容易从凝胶复合物中扩散出来[17]。因此我们希望针对大鼠肝切片寻求一个合适的温度提升，在 12v 37°C 电泳的基础上加以短时间的升温电泳，从而在保护组织结构的前提下来进一步提高肝切片的相对透明度。考虑到这些我们在 12v 37°C 电泳的基础上设置了 37-57°C 温度梯度的 48h 升温电泳，最后发现在 52°C 的升温电泳对大鼠肝切片来说脂质清除效果最好，肝切片透亮并且也没有发生形变，而继续升温可能有组织变性的风险。另一方面透明化技术的应用与免疫荧光标记密不可分，而透明化组织的荧光标记深度往往决定了能否在三维层面对组织结构进行研究。为了能说明使用这种清除方法得到的肝透明化组织具备一定的荧光标记深度，我们使用了 DAPI 对清除后的肝切片进行了核标记，并在激光共聚焦显微镜下扫描，结果也说明了经过 12v 37°C 48h+12v 52°C 48h 电泳清除的肝切片具备良好的荧光标记深度。当然对于不同规格的电泳设备和不同的组织来说，脂质清除所需要的时间可能会有所不同。对于肝组织的透明化，尤其是针对肝组织 ETC 的功率和电泳设备改良，仍然值得我们的进一步研究。

综上所述，我们的研究针对大鼠肝切片进行了 ETC 温度条件的探索，并基于一般实验室的条件进行了量化，给出了 ETC 快速脂质清除的温度参考指标，初步建立了大鼠肝脏透明化模型，有利于 CLARITY 技术在肝脏的结构功能以及乙肝、肝硬化、肝癌等疾病机理研究方面的进一步应用。

参考文献：

[1]. 邬国斌，何剑波，连芳. CLARITY 技术及其在生物学研究中的应用进展.中国癌症防治杂志,2015, 7(2):139-141. Wu GB,He JB,Lian F. The developments of CLARITY in biological research. Chin J of Oncol Prev and Treat, 2015, 7(2):139-141.

[2]. Chung K, Wallace J, Kim SY, et al.Structural and molecular interrogation of intact biological systems[J].Nature, 2013, 497(7449):332-337.

[3]. Phillips J, Laude A, Lightowlers R, et al. Development of passive CLARITY and immunofluorescent labelling of multiple proteins in human cerebellum: understanding mechanisms of neurodegeneration

in mitochondrial disease[J]. Scientific reports, 2016,6(1): 26013.
[4]. Liu AK, Hurry ME, Ng OT, et al. Bringing CLARITY to the human brain: visualization of Lewy pathology in three dimensions[J]. Neuropathology and Applied Neurobiology,2016,42(6):573-587.
[5]. Epp JR, Niibori Y, Liz Hsiang HL, et al. Optimization of CLARITY for Clearing Whole-Brain and Other Intact Organs[J]. eNeuro,2015,2(3): e0022-15.
[6]. Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, et al. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing[J]. Cell, 2014,158(4):945-958.
[7]. Mao Z, Zhu D, Hu Y, et al.Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro[J]. Journal of biomedical optics,2008,13(2):021104.
[8]. Willard AM, Gittis AH. Mapping neural circuits with CLARITY[J]. eLife, 2015,4(1):e11409.
[9]. Zheng H, Rinaman L. Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labeling in the developing rat brain[J]. Brain structure & function, 2016,221(4):2375-2383.
[10]. Zhang MD, Tortoriello G, Hsueh B, et al. Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014,111(12):E1149-1158.
[11]. Woo J, Lee M, Seo JM, et al. Optimization of the optical transparency of rodent tissues by modified PACT-based passive clearing[J]. Experimental & molecular medicine, 2016,48(12):e274.
[12]. Yu T, Qi Y, Zhu J, et al. Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue[J]. Scientific reports,2017,7(1):38848.
[13]. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO[J]. Nature methods,2016,13(10):859-867.
[14]. Tomer R, Ye L, Deisseroth K ,et al. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues[J]. Nature protocols, 2014,9(7):1682-1697.
[15]. Lee H, Park JH, Seo I, et al. Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine[J]. BMC developmental biology, 2014,14(48):781.
[16]. Li J, Czajkowsky DM, Li X, Shao Z. Fast immuno-labeling by electrophoretically driven infiltration for intact tissue imaging[J]. Scientific reports, 2015,5(1):10640.
[17]. Hammouda B. Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water[J]. Journal of research of the National Institute of Standards and Technology, 2013,118(1):151-167.